

Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Profenofos (Characterization of Profenofos Degrading Bacteria)

Alina Akhdiya^{1*}, Wartono¹, Eman Sulaeman², dan I Made Samudra¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8622833; Faks. (0251) 8622833; *E-mail: alinakhdiya@pertanian.go.id

²Balai Penelitian Lingkungan Pertanian, Jl. Raya Jakenan-Jaken Km. 05, Area Sawah, Sidomukti, Pati 59182 Indonesia

Diajukan: 9 Mei 2018; Direvisi: 8 Juni 2018; Diterima: 28 Juni 2018

ABSTRACT

Bioremediation is an inexpensive, easy, and safe technology to rehabilitate agricultural land which is highly polluted with pesticides. The aims of this study were to isolate and characterize profenofos degrading bacteria isolated from Pangalengan soils. The isolation step was carried out by using spread plate method on Nitrate Mineral Salts (NMS) medium containing 100 ppm profenofos. The isolates were selected based on hypersensitive response (HR) and hemolytic test, and ability of the isolates to use and degrade profenofos. The selected isolates were characterized based on the sequence of 16 rRNA and detection of the α and β subunits of terminal deoxygenase and naphtalene dioxygenase encoded genes. Three isolates (CN26, CN44, and CN86), which could use profenofos as the exclusive C source, could degrade more than 86.75% profenofos containing growth medium. Based on the 16S rRNA sequences, the three isolates were closely related to *Stenotrophomonas maltophilia* (99%), *Comamonas terrigena* (99%), and *Pseudomonas* sp. (80%). *Pseudomonas* CN44 consistently showed high profenofos degradation activity of up to 91.2% when grown on NMS medium (pH 6.8) for 72 hours. β subunit dioxygenase encoding gene of the isolates were detected using primers Rf2-F/Rf2-R, but optimization of PCR is still needed to detect the α subunit of the gene. Naphtalene dioxygenase gene was detected only from *Pseudomonas* CN44 using the primer pair 301f/1099r. Based on its biodegradation capability and molecular characteristics, *Pseudomonas* CN44 is very potential to be developed as a bioremediating agent of profenofos.

Keywords: Bacteria, insecticide degradation, profenofos, dioxygenase.

ABSTRAK

Bioremediasi merupakan salah satu teknologi yang murah, mudah, dan aman untuk merehabilitasi lahan pertanian yang telah tercemar pestisida. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengarakterisasi secara molekuler bakteri pendegradasi insektisida profenofos dari tanah asal lahan pertanian Pangalengan. Bakteri diisolasi menggunakan teknik cawan sebar pada media *Nitrate Mineral Salts* (NMS) yang mengandung profenofos 100 ppm. Pemilihan isolat dilakukan berdasarkan uji *hypersensitive response* (HR) dan hemolitik, serta kemampuan isolat dalam menggunakan dan mendegradasi profenofos. Isolat yang terpilih dikarakterisasi molekuler berdasarkan sekuen 16S rRNA, deteksi gen penyandi subunit α dan β terminal dioksigenase dan naftalen dioksigenase. Hasil penelitian menunjukkan tiga isolat (CN26, CN44, dan CN86) mampu menggunakan profenofos sebagai sumber C eksklusif dan mendegradasi lebih dari 86,75% profenofos yang terkandung di dalam media pertumbuhannya. Berdasarkan sekuen 16S rRNA, ketiga isolat tersebut berturut-turut teridentifikasi sebagai *Stenotrophomonas maltophilia* (99%), *Comamonas terrigena* (99%), dan *Pseudomonas* sp. (80%). *Pseudomonas* CN44 secara konsisten menunjukkan kemampuan mendegradasi profenofos yang tinggi, mencapai 91,2%, ketika ditumbuhkan pada media NMS dengan pH 6,8 selama 72 jam. Gen penyandi subunit β dioksigenase dari ketiga isolat berhasil dideteksi menggunakan pasangan primer Rf2-F/Rf2-R, tetapi untuk penyandi subunit α masih perlu dilakukan optimasi kondisi PCR. Gen naftalen dioksigenase hanya berhasil dideteksi dari *Pseudomonas* CN44 menggunakan pasangan primer 301f/1099r. Berdasarkan kemampuan biodegradasi dan karakteristik molekulernya, *Pseudomonas* CN44 sangat potensial untuk dikembangkan sebagai agen bioremediasi profenofos.

Kata kunci: Bakteri, degradasi insektisida, profenofos, dioksigenase.

PENDAHULUAN

Pestisida sintetik merupakan sarana pengendali organisme pengganggu tanaman (OPT) yang menjadi pilihan mayoritas petani karena efektif dan mudah digunakan. Pada umumnya, semakin luas spektrum suatu pestisida, semakin disukai oleh petani. Salah satu insektisida berspektrum luas yang banyak digunakan adalah profenofos (*O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorothioate*). Insektisida ini cukup stabil terhadap reaksi fotolisis dalam air (TOXNET 2018). Masa persistensi profenofos dalam tanah berkisar 7–17 hari (Gupta et al. 2011), dengan rata-rata waktu paruh 9 hari (TOXNET 2018). Umumnya, petani cenderung menggunakan pestisida melebihi dosis yang direkomendasikan, meskipun secara konsepsional pestisida merupakan alternatif terakhir dalam pengendalian serangan OPT. Penggunaan pestisida yang tidak rasional dan berlebihan dalam jangka panjang berakibat terhadap peningkatan residu pada tanah (Brar et al. 2017), air (Shakerkhatibi et al. 2014), dan produk-produk pertanian (Amilia et al. 2016; Fitriadi dan Putri 2016).

Saat ini, telah banyak publikasi ilmiah yang memaparkan dampak negatif peningkatan residu pestisida terhadap lingkungan (Joko et al. 2017) dan kesehatan (Alen dan Suharti 2015; Del Prado-Lu 2015). Akumulasi residu pestisida dalam lingkungan tanah dapat menyebabkan perubahan mikroflora tanah di antaranya penghambatan mikroba pemfiksasi nitrogen, seperti *Rhizobium*, *Azotobacter*, dan *Azospirillum*, serta mikroba pelarut fosfat dan selulolitik sehingga dalam jangka panjang dapat memengaruhi kesehatan dan produktivitas tanah (Chawla et al. 2013). Residu pestisida yang merembes ke dalam air tanah dan masuk ke badan perairan menimbulkan masalah bagi kehidupan organisme akuatik (Smital et al. 2004). Pada akhirnya, bioakumulasi residu akan terjadi pada manusia sebagai puncak rantai makanan. Percobaan yang dilakukan pada mencit menunjukkan bahwa paparan profenofos menyebabkan hemoragi kapiler darah, edema, nekrosis, pengerutan glomerulus, pembentukan vakuola yang besar di dalam sitoplasma, serta penghancuran nukleus, membran mitokondria, dan krista pada jaringan ginjal (Singh et al. 2016).

Sebagian mikroba mampu mendegradasi senyawa organik pencemar serta menggunakannya sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhannya. Kemampuan biodegradasi tersebut dapat dimanfaatkan untuk mengatasi masalah cemaran pestisida dengan teknik bioremediasi (Siripattanakul et al. 2009).

Bioremediasi merupakan teknologi yang aman, mudah, dan ekonomis untuk merehabilitasi lahan yang tercemar pestisida. Pengembangan agen bioremediasi yang unggul dan aman memerlukan mikroba yang memiliki kemampuan yang tinggi dengan karakteristik yang jelas sehingga tidak menimbulkan bahaya bagi manusia dan lingkungan. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengarakterisasi secara molekuler bakteri pendegradasi insektisida profenofos dari tanah asal lahan pertanian Pangalengan.

BAHAN DAN METODE

Isolasi dan Penyimpanan Isolat Bakteri Pendegradasi Insektisida Profenofos

Bakteri diisolasi dari empat sampel tanah lahan pertanian padi (sawah), tomat, kentang, dan kol yang terdapat di Kampung Legok Bako, Desa Margaluyu, Kecamatan Pangalengan, Kabupaten Bandung. Sebanyak 5 g sampel tanah disuspensikan dengan 45 ml akuades. Setiap suspensi di-vortex selama 1 menit kemudian didiamkan hingga mengendap. Dari setiap suspensi diambil sebanyak 50 µl yang kemudian disebar pada cawan agar *Nitrate Mineral Salts* (NMS) (Ohshiro et al. 1996) yang mengandung profenofos 100 ppm. Media yang telah diinokulasi tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Koloni-koloni bakteri yang menampilkan morfologi yang berbeda dipilih dan dimurnikan dengan metode gores kuadran pada media agar NMS yang mengandung *Trypticase Soy Broth* (TSB) 0,3% (b/v). Isolat murni yang diperoleh diremajakan dan diperbanyak pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) (Himedia, India). Biomassa sel kultur padat umur 48–72 jam diambil menggunakan lup inokulasi, kemudian dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* yang telah berisi 500 µl gliserol 40% steril. Tabung *eppendorf* tersebut ditutup rapat, diberi label, dan di-vortex agar homogen, selanjutnya disimpan pada suhu -20°C.

Seleksi Isolat Bakteri Pendegradasi Profenofos

Uji *hypersensitive response* (HR)

Pengujian ini dilakukan dengan tujuan menyeleksi mikroba yang berpotensi menjadi patogen tanaman. Satu lup massa sel bakteri diambil dari koloni yang tumbuh pada media TSA (Himedia, India) umur 1–3 hari kemudian disuspensikan dengan 1 ml akuades steril. Suspensi bakteri tersebut disuntikkan ke permukaan bawah daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) umur 10 minggu dengan *syringe* 1 ml tanpa

jarum (Zou et al. 2006). Uji HR setiap isolat bakteri dilakukan dengan dua ulangan. Pengamatan terhadap respons HR pada bagian daun yang diinfeksi dilakukan setiap hari selama 7 hari berturut-turut.

Uji aktivitas hemolitik

Isolat-isolat yang menunjukkan respons HR negatif diinokulasikan pada media agar darah yang komposisinya terdiri atas *Blood Agar Base* (BBL™) 40 g/l dan darah domba steril 50 ml/l yang telah didefibrinasi. Selanjutnya, media tersebut diinkubasi selama 1–5 hari pada suhu ruang (29–30°C) sambil diamati terbentuknya zona jernih di sekitar koloni yang tumbuh. Isolat-isolat yang bersifat nonhemolitik digunakan sebagai bahan pengujian berikutnya.

Uji Penggunaan Profenofos sebagai Sumber Karbon Eksklusif dan Penetapan Aktivitas Degradasi Profenofos

Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasikan satu lup bakteri ke dalam 50 ml media NMS cair yang telah ditambahkan insektisida berbahan aktif profenofos 500 mg/l (PT Syngenta Indonesia) dengan konsentrasi akhir 100 ppm. Media yang telah diinokulasi selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang sambil dikocok menggunakan *IKA®KS 260 Basic Rotary Shaker* (IKA-Werke GmbH & Co. KG) pada kecepatan 75 rpm selama 72 jam. Pertumbuhan bakteri diamati secara visual untuk peningkatan kekeruhan kulturnya. Selanjutnya, kultur-kultur isolat yang mampu menggunakan profenofos sebagai satu-satunya sumber C untuk pertumbuhannya disentrifugasi. Supernatan kultur dikirim ke Laboratorium Residu Bahan Agrokimia, Balai Penelitian Lingkungan Pertanian (Balingtan), Bogor untuk ditetapkan kadar residunya. Penetapan residu profenofos dengan menggunakan perangkat GC (*Varian type 450*) dilengkapi dengan kolom VF1701 dan *electrone captured detector* dengan mengacu pada Komisi Pestisida (2006). Sebagai standar, digunakan *analytical standard profenofos* (Sigma-Aldrich). Persentase profenofos yang terdegradasi dihitung menggunakan formula berikut:

Persentase profenofos yang terdegradasi =

$$\frac{\text{Konsentrasi awal} - \text{Konsentrasi akhir}}{\text{Konsentrasi awal}} \times 100\%$$

Tiga isolat yang menunjukkan kemampuan degradasi profenofos tertinggi diuji kembali aktivitas biodegradasi profenofosnya. Satu lup bakteri diinokulasikan ke dalam 5 ml media NMS cair yang mengandung insektisida profenofos 100 ppm. Selanjutnya, media diinkubasi sebagaimana disebutkan

di atas selama 48 jam. Sebanyak 1 ml kultur tersebut diinokulasikan ke dalam 100 ml media NMS ditambah profenofos 100 ppm, kemudian diinkubasi sambil dikocok di atas *shaker*. Setelah 72 jam, kultur disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dikirim ke Laboratorium Residu Bahan Agrokimia, Balingtan untuk penetapan residu profenofosnya.

Identifikasi Isolat Bakteri Terpilih dan Deteksi Gen Dioksigenase

Tiga isolat yang memiliki kemampuan tinggi dalam mendegradasi residu profenofos dipilih untuk selanjutnya diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S rRNA. DNA genom diekstraksi menggunakan *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid, AS) dengan mengikuti protokol yang direkomendasikan oleh produsennya. DNA yang diperoleh kemudian digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk amplifikasi DNA 16S rRNA dan untuk mendeteksi gen penyandi dioksigenase. Amplifikasi DNA 16S rRNA dan gen dioksigenase subunit α dan β berturut-turut dilakukan dengan menggunakan pasangan primer 27f/1492r (Weisburg et al. 1991) dan Rf1 (Kahng dan Oh 2005) yang dipasangkan dengan Rr1 (Zhou et al. 2006) serta Rf2-F/Rf2-R (Kim et al. 2006). Deteksi gen penyandi subunit besar naftalen dioksigenase dilakukan dengan menggunakan pasangan primer 301f dan 1099r (Wald et al. 2015). Kondisi PCR untuk amplifikasi DNA 16S rRNA dan gen penyandi dioksigenase ditampilkan pada Tabel 1. Reaksi PCR dilakukan menggunakan *AccuPower® PCR PreMix* (Bioneer, Korea Selatan). Hasil amplifikasi tersebut dielektroforesis pada gel agarosa 1% (Caisson, AS) dengan menggunakan *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, AS) sebagai *marker*. Elektroforesis dilakukan selama 40 menit pada tegangan listrik 80 V dalam bufer TAE 1×. DNA ampikon dalam gel agarosa diwarnai dengan *Diamond™ Nucleic Acid Dye* (Promega, AS) sebelum divisualisasi di atas *UV transilluminator*. Ampikon 16S rDNA lalu dikirim ke perusahaan jasa sekuensing. Hasil sekuensing dianalisis kesejajarannya menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 5.05, kemudian disejajarkan dengan sekuen DNA 16S rRNA yang terdapat pada basis data *GenBank®* (NCBI) menggunakan *BLAST-n* sehingga diperoleh berbagai sekuen DNA 16S rRNA bakteri lain yang memiliki kemiripan terdekat. Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1000× pada MEGA versi 5.05 (Tamura et al. 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perolehan Isolat Bakteri Pendegradasi Insektisida Profenofos

Total koloni bakteri yang tumbuh pada media isolasi berjumlah 529 dengan perolehan terbanyak dari contoh tanah sawah (Tabel 2). Sembilan belas koloni di antaranya dikelilingi oleh zona jernih (Tabel 2). Isolat-isolat yang dimurnikan dari 19 koloni tersebut diberi kode CN.

Zona jernih di sekitar koloni tersebut menunjukkan adanya aktivitas degradasi profenofos oleh sel-sel bakteri dalam koloni. Profenofos berbentuk

cairan berwarna kuning muda dan mempunyai kelarutan dalam air 28 mg/l pada 25°C (TOXNET 2018). Apabila senyawa ini ditambahkan ke dalam air pada konsentrasi cukup tinggi, akan terbentuk suspensi yang keruh. Degradasi profenofos menghasilkan senyawa turunan yang lebih sederhana dan mempunyai kelarutan dalam air yang lebih tinggi sehingga tampak jernih (Gambar 1).

Seleksi Isolat Bakteri Pendegradasi Profenofos

Hasil uji HR menunjukkan 19 isolat bakteri tersebut tidak menimbulkan respons hipersensitif pada daun tembakau (Gambar 2). Hal ini mengindikasikan

Tabel 1. Kondisi reaksi PCR untuk amplifikasi 16S rRNA dan gen penyandi dioksigenase.

Tahapan reaksi	16S rRNA		Gen penyandi dioksigenase	
	Suhu (°C)	Waktu	Suhu (°C)	Waktu
Pradenaturasi	94	5 menit	94	5 menit
Denaturasi	94	1,5 menit	94	1,5 menit
Penempelan primer: 27f/1492r	55	45 detik		
Rf1/Rr1			50–57	45 detik
Rf2-F/Rf2-R			50–57	45 detik
301f/1099r			55	45 detik
Pemanjangan	72	1 menit	72	1 menit
Pemanjangan akhir	72	1 menit	72	1 menit
Jumlah siklus reaksi	30		30	

Tabel 2. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media agar *Nitrate Mineral Salts* (NMS) yang mengandung profenofos 100 ppm.

Asal sampel	Jumlah koloni yang tumbuh	Koloni yang dikelilingi zona jernih
Lahan padi (sawah)	240	2
Lahan pertanaman tomat	157	7
Lahan pertanaman kentang	47	7
Lahan pertanaman kol	85	3
Total	529	19

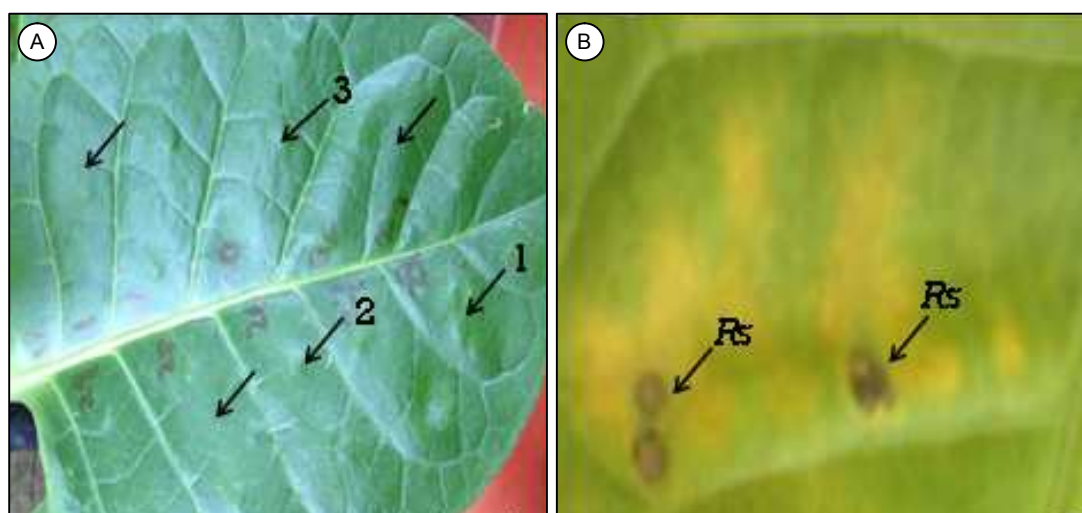


Gambar 1. Zona jernih yang terbentuk di sekitar koloni bakteri pendegradasi profenofos yang tumbuh pada media agar NMS mengandung profenofos 100 ppm.

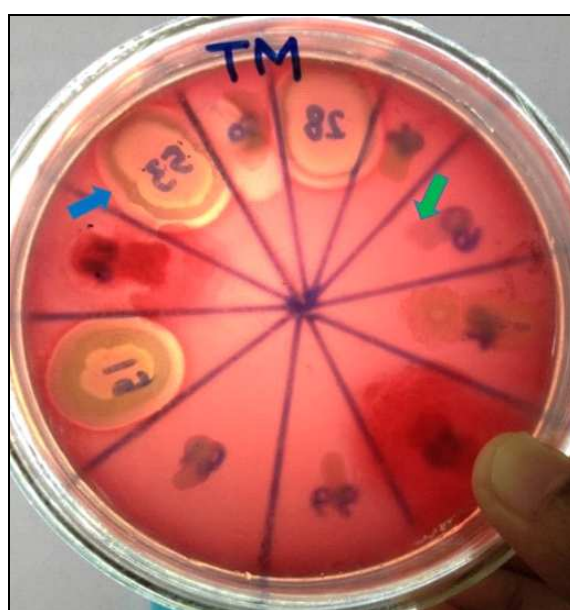
bahwa 19 isolat tersebut tidak bersifat patogenik terhadap tanaman. Sebaliknya, jaringan daun tembakau yang disuntik dengan suspensi *Ralstonia solanacearum* (fitopatogen) menunjukkan kematian jaringan daun (Gambar 2). Respons hipersensitif terjadi sebagai reaksi atas infeksi mikroba fitopatogenik. Induksi respons hipersensitif dan patogenisitas di antaranya dipengaruhi oleh produk-produk ekspresi gen *hypersensitive reaction and pathogenicity (hrp)* yang umum ditemukan pada bakteri gram negatif patogen tanaman (Zhu et al. 2000).

Di antara 19 isolat bakteri nonfitopatogenik yang dihasilkan pada penelitian ini, 9 isolat di antaranya

tidak menunjukkan aktivitas hemolitik ketika ditumbuhkan pada media agar darah (Gambar 3). Aktivitas hemolitik adalah peristiwa luruhnya membran eritrosit oleh hemolisin yang menyebabkan keluarnya isi sel dan lepasnya molekul hemoglobin yang terkandung di dalamnya (Mangindaan dan Losung, 1991). Lepasnya molekul hemoglobin menyebabkan patogen dapat mengekstrak unsur besi yang diperlukan untuk *survival* dan mempertahankan patogenisitasnya terhadap mamalia (Luo et al. 2001). Terdapat tiga tipe lisis sel darah merah karena aktivitas mikroba, yaitu hemolisis alfa, hemolisis beta, dan hemolisis gamma (Madigan et al. 2006). Hemolisis



Gambar 2. Kondisi daun tembakau pada 48 jam setelah uji *hypersensitive response* menggunakan isolat-isolat pendegradasi profenofos. (A) Isolat-isolat: 1 = CN86, 2 = CN26, 3 = CN44. (B) *Ralstonia solanacearum* (Rs).



Gambar 3. Tampilan koloni isolat-isolat yang bersifat hemolitik (panah berwarna biru) dan nonhemolitik (panah berwarna hijau) pada agar darah.

beta adalah proses lisis sempurna sehingga menyebabkan terbentuknya zona jernih di sekitar koloni bakteri (Mangindaan dan Losung 1991), sedangkan hemolisis alfa adalah hemolisis parsial yang akan menimbulkan warna hijau di sekitar koloni bakteri. Warna hijau berasal dari biliverdin yang merupakan produk sampingan dari pemecahan hemoglobin (Madigan et al. 2006). Isolat-isolat yang bersifat hemolitik berpotensi menjadi patogen bagi mamalia sehingga hanya isolat-isolat bakteri yang nonhemolitik, yaitu CN22, CN25, CN26, CN44, CN46, CN47, CN59, CN81, dan CN86 yang digunakan pada tahap pengujian selanjutnya.

Pengamatan secara visual terhadap kekeruhan kultur menunjukkan bahwa 6 dari 9 isolat yang bersifat nonhemolitik memperlihatkan pertumbuhan yang baik pada media NMS cair yang mengandung profenofos sebagai satu-satunya sumber karbon. Analisis residu yang dilakukan terhadap enam isolat tersebut menunjukkan kisaran degradasi residu profenofos mencapai 85,39–88,85% (Tabel 3). Isolat CN26, CN44, dan CN86 merupakan tiga isolat yang memiliki kemampuan degradasi profenofos relatif lebih tinggi dibanding dengan tiga isolat lainnya, yaitu lebih besar daripada 86,75% (Tabel 3). Verifikasi ulang terhadap aktivitas biodegradasi yang dilakukan pada media NMS menunjukkan konsistensi kemampuan degradasi profenofos oleh isolat CN44 yang

tinggi, yaitu 91,22% (Tabel 4), sedangkan isolat CN26 dan CN86 menunjukkan penurunan aktivitas degradasi (Tabel 4).

Persistensi profenofos di dalam tanah sangat dipengaruhi oleh pH dan tingkat oksidasi (redoks) tanah. Pada tanah yang basa, insektisida ini cepat dimetabolisme oleh mikroba yang ada, baik pada kondisi aerobik maupun anaerobik. Namun pada kondisi netral atau asam, metabolisme profenofos menjadi lebih lambat. Pada pH 5 dan 7, waktu paruh insektisida ini berturut-turut adalah 104–108 hari dan 24–62 hari. Namun pada kondisi anaerobik dan pH 7,8 (alkalin), waktu paruh profenofos rata-rata 3 hari (TOXNET 2018). Tingginya persentase profenofos yang berhasil didegradasi oleh isolat CN44 (91,22%) dan CN26 (86,72%) pada kondisi aerobik dan pH 6,8 dalam durasi 72 jam menunjukkan bahwa kemampuan biodegradasi profenofos kedua isolat tersebut sangat tinggi sehingga sangat potensial untuk dikembangkan sebagai komponen agen bioremediasi pestisida.

Karakterisasi Isolat Bakteri Terpilih secara Molekuler

Hasil analisis sekuen gen penyandi 16S rRNA pada *GenBank*® menggunakan program *BLAST-n* menunjukkan bahwa isolat CN26 dan CN86 memiliki

Tabel 3. Kemampuan degradasi profenofos enam isolat bakteri terpilih.

Kultur isolat	Profenofos yang didegradasi (%)*
CN26	88,64 ± 0,29
CN44	88,85 ± 0,28
CN46	85,39 ± 0,87
CN59	86,75 ± 1,10
CN81	86,74 ± 1,02
CN86	86,79 ± 0,80

*Dihitung dari residu profenofos yang dianalisis menggunakan teknik kromatografi gas menurut Komisi Pestisida (2006).

Tabel 4. Hasil verifikasi kemampuan degradasi profenofos isolat CN26, CN44, dan CN86.

Kultur isolat	Profenofos yang didegradasi (%)*
CN44	91,22 ± 1,48
CN26	86,72 ± 1,63
CN86	73,41 ± 4,73

*Dihitung dari residu profenofos yang dianalisis menggunakan teknik kromatografi gas menurut Komisi Pestisida (2006).

Tabel 5. Hasil karakterisasi isolat CN26, CN44, dan CN86 berdasarkan data sekuen 16S rRNA.

Kode isolat	Deskripsi	Query length	Query cover (%)	E value	Identity (%)	Accession
CN26	<i>Comamonas terrigena</i> strain NBRC 12685	738	100	0	99	NR.113597.1
CN44	<i>Pseudomonas</i> sp. sxdyx1	1.097	82	5e-178	80	FJ237011.1
CN86	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain ATCC 19861	813	99	0	99	NR.040804

tingkat kemiripan yang sangat tinggi berturut-turut dengan *Comamonas terrigena* strain NBRC 12685 dan *Stenotrophomonas maltophilia* strain ATCC 19861. Sementara, sekuen 16S rRNA isolat CN44 hanya 80% mirip dengan *Pseudomonas* sp. sxdyx1 (Tabel 5). Berdasarkan kriteria Schlager et al. (2012), isolat CN44 berpotensi sebagai genus baru karena persentase kemiripannya di bawah 95%. Namun, diperlukan analisis lebih lanjut terhadap sekuen 16S rRNA yang lebih panjang serta telaah fisiologis dan biokimia sebagai syarat untuk menyatakannya sebagai spesies atau genus baru.

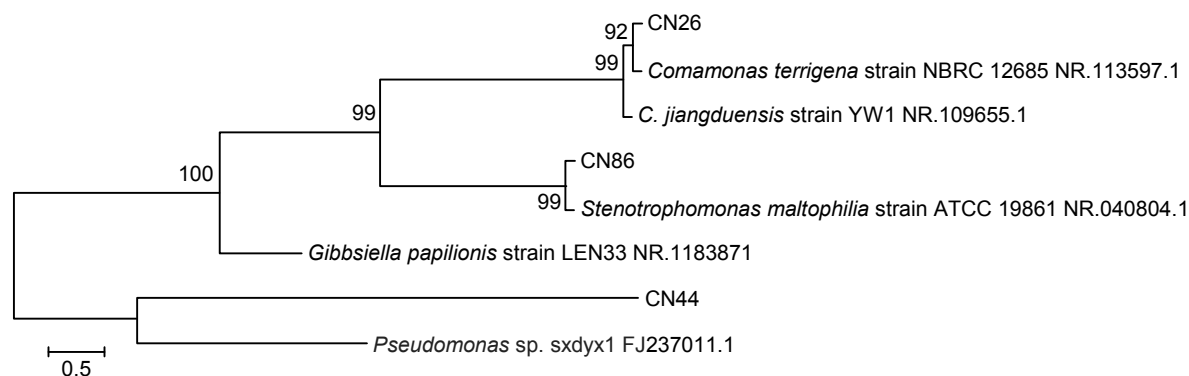
Konstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat CN26 berkerabat dekat dengan *C. terrigena* strain NBRC 12685 dan berada dalam satu klaster dengan *C. jiangduensis* strain YW1 (Gambar 4). Isolat CN86 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *S. maltophilia* strain ATCC 19861, sedangkan isolat CN44 berkerabat dekat dengan *Pseudomonas* sp. strain sxdyx1 (Gambar 4).

Berdasarkan hasil penelusuran berbagai rujukan ilmiah, sebagian anggota genus *Comamonas* (Providenti et al. 2001), *Stenotrophomonas* (Dubey dan Fulekar, 2012; Deng et al. 2015), dan *Pseudomonas* yang telah diketahui sebagai bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi senyawa hidrokarbon aromatik termasuk profenofos. Namun, di antara ketiga genus tersebut, publikasi ilmiah tentang biodegradasi pestisida dan hidrokarbon aromatik oleh *Pseudomonas* jauh lebih banyak. Mayoritas rujukan ilmiah juga menunjukkan bahwa *Pseudomonas* memiliki kemampuan biodegradasi yang lebih baik dengan kisaran substrat yang juga lebih luas termasuk *organochlorine pesticides* (Singh dan Walker 2006; Tamilselvan et al. 2014; Wald et al. 2015; Satish et al. 2017). Studi metabolomik mengindikasikan kemampuan *Pseudomonas* tersebut terkait dengan ragam *biodegradation pathway* yang dimilikinya (Pailan dan Saha 2015).

Pseudomonas sp. CN44 hanya memerlukan waktu 72 jam untuk mendegradasi 91,22% profenofos (Tabel 4) yang ditumbuhkan pada media pertumbuhan. Kemampuan degradasi *Pseudomonas* sp. CN44 lebih baik dibanding dengan konsorsium *P. plecoglossicida* dan *P. aeruginosa* yang memerlukan waktu 96 jam untuk mendegradasi 90% profenofos dalam media cair pertumbuhannya (Siripattanakul-Ratpukdi et al. 2017). Demikian juga, *P. putida* yang diisolasi oleh Malghani et al. (2009) dari Hubei, Cina memerlukan waktu 96 jam untuk mendegradasi 92,37% residu profenofos. Oleh karena itu, *Pseudomonas* CN44 layak disejajarkan atau bahkan mungkin lebih baik kemampuannya dalam mendegradasi dibanding dengan isolat-isolat *Pseudomonas* yang dipublikasikan tersebut. Demikian pula, kemampuan biodegradasi profenofos *Stenotrophomonas* CN86 yang diperoleh pada penelitian ini (Tabel 3 dan 4) jauh lebih tinggi daripada *Stenotrophomonas* sp. G1 (38%) yang diisolasi oleh Deng et al. (2015) dari lumpur saluran limbah pabrik klorpirifos di Nantong, Jiangsu, Cina.

Kemampuan suatu mikroba dalam mendegradasi senyawa aromatik hidrokarbon dipengaruhi oleh karakter intrinsiknya seperti ragam enzim-enzim pendegradasi ekstraselular dan intraselular yang dimiliki. Anggota genus *Pseudomonas* memiliki beragam enzim pendegradasi senyawa hidrokarbon, di antaranya hidrolase dan berbagai oksigenase (Singh dan Walker 2006; Karigar dan Rao 2011; Siripattanakul-Ratpukdi et al. 2014; Satish et al. 2017). Enzim-enzim pendegradasi tersebut disandikan oleh gen-gen katabolik yang berada di dalam kromosom, plasmid, atau transposon (Satish et al. 2017).

Proses penting dalam biodegradasi senyawa aromatik hidrokarbon adalah pembukaan cincin aromatik melalui oksidasi enzimatis. Enzim kunci yang berperan penting dalam proses oksidasi tersebut adalah dioksigenase yang bersifat *enantio specific*.



Gambar 4. Pohon filogenetik tiga isolat bakteri pendegradasi profenofos dan kerabat dekatnya berdasarkan hasil sekuen 16S rRNA.

Aktivasi katalitik dioksigenase mengintroduksi dua atom oksigen pada cincin aromatik sehingga menyebabkan pecahnya cincin aromatik (Das dan Chandran 2011; Karigar dan Rao 2011; Gupte et al. 2016).

Molekul dioksigenase terdiri atas beberapa komponen rantai transpor elektron dan dioksigenase terminal (Kumar dan Khanna 2010). Deteksi gen penyandi dioksigenase ketiga isolat menggunakan primer subunit α dan β *Rieske center* tidak menghasilkan amplikon subunit α *Rieske center* (700 bp), walaupun telah dilakukan optimasi kondisi PCR. Sebaliknya, deteksi penyandi subunit β *Rieske center* dioksigenase terminal menghasilkan amplikon berukuran 500 bp sebagaimana yang diharapkan (Gambar 5).

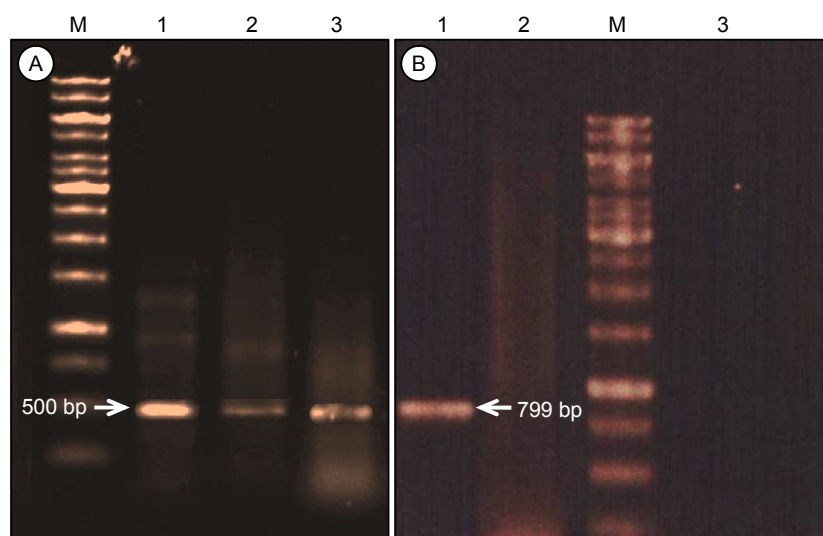
Semakin kompleks dan banyak cincin aromatik suatu senyawa hidrokarbon, semakin lama persistensinya karena molekulnya semakin stabil sehingga semakin sulit didegradasi (Bisht et al. 2015). Sebagai konsekuensinya, diperlukan sistem enzim yang lebih kompleks untuk proses biodegradasinya. Untuk melihat potensi ketiga bakteri dalam mendegradasi senyawa aromatik yang lebih kompleks, dilakukan deteksi gen penyandi naftalen dioksigenase. Naftalen dioksigenase berperan dalam mengatalisis reaksi oksigenasi senyawa aromatik bercincin ganda seperti naftalen dan bercincin 3 seperti antrasen (Zhou et al. 2006). Deteksi gen penyandi subunit besar naftalen dioksigenase menggunakan primer 301f/1099r menghasilkan amplikon yang diharapkan (799 bp) untuk *Pseudomonas* sp. CN44, tapi tidak berhasil untuk *C. terrigena* CN26 (Gambar 5). Hasil deteksi ini berbeda

dengan hasil penelitian Wald et al. (2015) yang menunjukkan keberadaan gen *naphtalene-like dioxygenase* pada *C. terrigena* dan korelasinya dengan kemampuan bakteri tersebut dalam menggunakan naftalen sebagai sumber C eksklusif. Penyebab tidak terdeteksinya gen tersebut pada *C. terrigena* CN26 antara lain dapat disebabkan karena isolat tersebut memang tidak memiliki gen yang dimaksud atau karena kondisi PCR yang tidak optimum.

Kondisi PCR yang tidak optimum dapat disebabkan oleh temperatur yang tidak tepat pada setiap fase PCR, komposisi reaksi PCR yang tidak optimum, atau primer yang digunakan kurang sesuai. Ketidaksesuaian primer dapat terjadi jika primer yang didesain berdasarkan informasi sekuen gen yang tersedia di bank gen atau dari *culturable microbes* digunakan untuk mendeteksi atau mengamplifikasi gen-gen dari species yang berbeda, *novel species*, atau *not yet culturable species* yang DNA-nya diekstrak langsung dari sampel lingkungan. Basis data gen-gen yang terkait lingkungan masih kurang memadai (Iwai et al. 2010), termasuk informasi sekuen DNA penyandi subunit α *Rieske center* yang tersedia di bank gen belum mewakili ragam gen-gen tersebut sehingga masih diperlukan eksplorasi lebih lanjut (Kumar dan Khanna 2010).

KESIMPULAN

Tiga bakteri yang mampu menggunakan profenofos sebagai sumber C eksklusif dan dengan kemampuan biodegradasi profenofos lebih dari



Gambar 5. Amplikon hasil amplifikasi PCR subunit β gen dioksigenase dan gen naftalen dioksigenase isolat bakteri CN44, CN26, dan CN86. (A) Amplikon subunit β gen dioksigenase (500 bp). (B) Amplikon gen naftalen dioksigenase (799 bp). Produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1%. 1 = CN44, 2 = CN26, 3 = CN86, M = 1 kb *ladder* (Thermo Fisher Scientific).

86,75% berhasil diisolasi dari tanah asal lahan pertanian di Pangalengan. Berdasarkan sekuen 16S rRNA, ketiga isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Comamonas terrigena* CN26, *Pseudomonas* sp. CN44, dan *Stenotrophomonas maltophilia* CN86. Di antara ketiga isolat tersebut, *Pseudomonas* sp. CN44 paling potensial untuk dikembangkan lebih lanjut karena kemampuan biodegradasinya yang konsisten tinggi terhadap profenofos serta karakter intrinsiknya mendukung pengembangan potensinya sebagai agen bioremediasi berbagai pestisida dan senyawa hidrokarbon aromatik lainnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai melalui DIPA BB Biogen TA 2016 dengan judul "Formulasi Bakteri Pendegradasi Residu Insektisida". Penulis mengucapkan terima kasih kepada Adheliya Setyorini yang telah membantu pelaksanaan penelitian dan pengumpulan data.

DAFTAR PUSTAKA

- Alen, Y., Zulhidayati & Suharti, N. (2015) Pemeriksaan residu pestisida profenofos pada selada (*Lactuca sativa* L.) dengan metode kromatografi gas. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 1 (2), 140–149.
- Amilia, E., Joy, B. & Sunardi, D. (2016) Residu pestisida pada tanaman hortikultura (studi kasus di Desa Cihanjuang Rahayu Kecamatan Parongpong Kabupaten Bandung Barat). *Jurnal Agrikultura*, 27 (1), 23–29.
- Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V. & Sharma, K.D. (2015) Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (1), 7–21.
- Brar, G.S., Patyal, S.K. & Banshtu, T. (2017) Persistence of acephate, profenofos, and triazophos residues in brinjal fruits and soil. *The Bioscan*, 12 (1), 33–37.
- Chawla, N., Sunita, S., Kamlesh, K. & Rakesh, K. (2013) Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 17 (4), 88–105.
- Das, N. & Chandran, P. (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 1–13. doi:10.4061/2011/941810.
- Del Prado-Lu, J.L. (2015) Insecticide residues in soil, water, and eggplant fruits and farmers' health effects due to exposure to pesticides. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 20 (1), 53–62.
- Deng, S., Chen, Y., Wang, D., Shi, T., Wu, X., Ma, X., Li, X., Hua, R., Tang, X. & Li, Q.X. (2015) Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by *Stenotrophomonas* sp.: G1. *Journal of Hazardous Materials*, 297 (30), 17–24.
- Dubey, K.K. & Fulekar, M. (2012) Chlorpyrifos bioremediation in *Pennisetum* rhizosphere by a novel potential degrader *Stenotrophomonas maltophilia* MHF ENV20. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 (4), 1715–1725.
- Fitriadi, B.R. & Putri, A.C. (2016) Metode-metode pengurangan residu pestisida pada hasil pertanian. *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan*, 11 (2), 61–71.
- Gupta, S., Gajbhiye, V.T., Sharma, R.K. & Gupta, R.K. (2011) Dissipation of cypermethrin, chlorpyrifos, and profenofos in tomato fruits and soil following application of pre-mix formulations. *Environmental Monitoring and Assessment*, 174 (14), 337–345.
- Gupte, A., Tripathi, A., Patel, H., Rudakiya, D. & Gupte, S. (2016) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs): A perspective. *The Open Biotechnology Journal*, 10, 363–378.
- Iwai, S., Chai, B., Sul, W.J., Cole, J.R., Hashsham, S.A. & Tiedje, J.M. (2010) Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. *ISME Journal*, 4 (2), 279–285.
- Joko, T., Anggoro, S., Sunoko, H.R. & Rachmawati, S. (2017) Pesticides usage in the soil quality degradation potential in Wanasari subdistrict, Brebes, Indonesia. *Applied and Environmental Soil Science*, 1–7. doi:10.1155/2017/5896191.
- Kahng, H.Y. & Oh, K.H. (2005) Molecular detection of catabolic genes for polycyclic aromatic hydrocarbons in the reed rhizosphere of Sunchon Bay. *Journal of microbiology*, 43 (6), 572–576.
- Karigar, C.S. & Rao, S.S. (2011) Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. *Enzyme Research*, 2011 (1). doi:10.4061/2011/805187.
- Kim, S. J., Kweon, O., Freeman, J.P., Jones, R.C., Adjei, M.D., Jhoo, J.W., Edmondson, R.D. & Cerniglia, C.E. (2006) Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low-and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2), 1045–1054.
- Kumar, M. & Khanna, S. (2010) Diversity of 16S rRNA and dioxygenase genes detected in coal-tar-contaminated site undergoing active bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, 108 (4), 1252–1262.
- Luo, G., Samaranayake, L.P. & Yau, J.Y.Y. (2001) *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (8), 2971–2974.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, D.P. (2006) *Brock Biology of Microorganisms*. 12th ed. San Francisco: Pearson Education.

- Malghani, S., Chatterjee, N., Yu, H.X. & Luo, Z. (2009) Isolation and identification of profenofos degrading bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40 (4), 893–900.
- Mangindaan, R.E.P. & Losung, F. (1991) Aktivitas hemolitik teripang (*Bohadschia graeffei*) dari pantai Malalayang, Sulawesi Utara pada beberapa suhu dan pH. *Jurnal Ilmiah Sains*, 13 (1), 27–33.
- Ohshiro, K., Kakuta, T., Sakai, T., Hirota, H., Hoshiro, T. & Uchiyama, T. (1996) Biodegradation of organophosphorus insecticides by bacteria isolated from turf green soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (3), 299–305.
- Pailan, S. & Saha, P. (2015) Chemotaxis and degradation of organophosphate compound by a novel moderately thermo-halo tolerant *Pseudomonas* sp. strain BUR11: Evidence for possible existence of two pathways for degradation. *Peer Journal*, 3, e1378. doi:10.7717/peerj.1378.
- Providenti, M.A., Mampel, J., MacSween, S., Cook, A.M. & Wyndham, R.C. (2001) *Comamonas testosteroni* BR6020 possesses a single genetic locus for extradiol cleavage of protocatechuate. *Microbiology*, 147 (8), 2157–2167.
- Satish, G.P., Ashokrao, D.M. & Arun, S.K. (2017) Microbial degradation of pesticide: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 11 (24), 992–1012.
- Shakerkhatibi, M., Mosaferi, M., Jafarabadi, M.A., Lotfi, E. & Belvasi, M. (2014) Pesticides residue in drinking groundwater resources of rural areas in the northwest of Iran. *Health Promotion Perspectives*, 4 (2), 195–205.
- Singh, B.K. & Walker, A. (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30 (3), 428–471.
- Singh, J.K., Roy, A.K. & Pankaj, P.P. (2016) Ameliorative effect of curcumin on profenofos induced oxidative damage of renal tissue in mice. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7 (8), 3550–3556.
- Siripattanakul, S., Vangnai, A.S., Sangthean, P. & Singkibut, S. (2014) Profenofos insecticide degradation by novel microbial consortium and isolates enriched from contaminated chili farm soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (1), 320–328.
- Siripattanakul, S., Wirojanagud, W., McEvoy, J.M., Limpiyakorn, T. & Khan, E. (2009) Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3), 986–992.
- Siripattanakul, S., Vangnai, A.S. & Patichot, W. (2017) Enhancement of profenofos remediation using stimulated bioaugmentation technique. *Journal of Advanced Oxidation Technology*, 20 (2), 2017–2025.
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, M., Vega, R.L. & Epel, D. (2004) Emerging contaminants—Pesticides, PPCPs, microbial degradation products, and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research—Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552 (12), 101–117.
- Tamilselvan, S., Joseph, S.J., Mugunthan, G., Kumar, A.S. & Ahamed, S.S.M. (2014) Biological degradation of metribuzin and profenofos by some efficient bacterial isolates, 9, 26–39.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10), 2731–2739.
- TOXNET (2018) Hazardous Substances Data Bank (HSDB): PROFENOFOS. Available at: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~uv4EbA:1>.
- Wald, J., Hroudova, M., Jansa, J., Vrchotova, B., Macek, T. & Uhlik, O. (2015) Pseudomonads rule degradation of polyaromatic hydrocarbons in aerated sediment. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1268. doi:10.3389/fmicb.2015.01268.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173 (2), 697–703.
- Zhou, H.W., Guo, C.L., Wong, Y.S. & Tam, N.F.Y. (2006). Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. *FEMS Microbiology Letters*, 262 (2), 148–157.
- Zhu, W., Magbanua, M.M. & White, F.F. (2000) Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*, 182 (7), 1844–1853.
- Zou, L.F., Wang, X.P., Xiang, Y., Zhang, B., Li, Y.R., Xiao, Y.L., Wang, J.S., Walmsley, A.R. & Chen, G.Y. (2006) Elucidation of the *hrp* clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (9), 6212–6224.